

# ネコ Scratch Reflexの耳介受容野からの求心線維の頸髄入口レベル

— 逆行性 HRP 法による検討 —

黒 沢 洋 一

札幌医科大学生理学第2講座 (主任 青木 藩 教授)

## Cervical Segmental Levels of Pinna Afferents Responsible for Scratching Reflex in the Cat

— A Study by Retrograde Horseradish Peroxidase Method —

Yoichi KUROSAWA

*Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical College*

*(Chief : Prof. M. Aoki)*

Spinal segmental levels of afferent fibers from the pinna receptive field of scratch reflex have been investigated by the retrograde horseradish peroxidase (HRP) method in cats. HRP solution (20–40 %, 2–40 mg) was injected into the localized areas of the pinna receptive field in 26 cases. Cats were allowed to survive for about 3 days. After fixation, frozen sections (60  $\mu$ m thick) of dorsal root ganglia (DRGs) from C1 to C5 segmental levels were cut and each section reacted histochemically with tetramethylbenzidine (TMB). HRP labeled cells in DRGs from C1 to C5 levels were counted under the light microscope using a bright-field illumination.

The results are summarized as follows.

1) In either case in which HRP was injected into bursella or scapha margin of the pinna receptive field, labeled cells were observed invariably in the DRGs from C1 to C3 levels. In several cases, labeled cells were found also in C4 DRG. No labeled cells were found in C5 DRG. Labeled cells were most numerous in C2 DRG of which the mean number of labeled cells in each section was over 60. The number of labeled cells was higher in the order of C2, C3 and C1 DRGs.

2) In order to reveal the quantitative difference in the segmental levels of the afferents from various parts of the pinna receptive field, the pinna was subdivided into several localized areas (tip, anterior and posterior part of the scapha margin, bursella, concha). In the cases of HRP injection into the scapha margin (14 cases), the number of labeled cells of C2 DRG (mean: 79/section) was significantly higher than those of C3 DRG (mean: 12/section) and C1 DRG (mean: 6/section). But in the cases of HRP injection into bursella (12 cases), there were no significant differences between the numbers of labeled cells of C2 (mean: 71/section) and C3 DRG (mean: 48/section). The number of labeled cells of C1 DRG (mean: 5/section) was significantly lower than those of C2 and C3 DRGs. In 4 cases, HRP was injected into concha irrelevant to the scratch reflex. Labeled cells were very scarce in cervical DRGs but numerous in cranial nerve (VII, X) ganglia.

3) Labeled cells in C1–C3 DRGs were spheroidal in shape and had mean diameters of 46–54  $\mu$ m, 30–38  $\mu$ m in their long and short axes, respectively. No somatotopic organization was observed within the ganglia.

These results may indicate that pinna afferents of the scratch reflex enter the spinal cord predominantly through the C1 to C3 dorsal roots. It was suggested that pinna afferents may consist of thin myelinated or unmyelinated axons. (Received August 1, 1985 and accepted August 5, 1985)

**Key words:** Scratch reflex, Pinna, Retrograde HRP method, Cervical dorsal root ganglion

## 1 緒 言

イヌ、ネコなどの哺乳動物で、耳介、体の背部、首などの体表面に、かゆみを生じさせるような軽い触刺激が加わると、ひっかき反射 (scratch reflex), すなわち、同側下肢を屈曲させ、同側前肢を外側から交叉して越え、刺激部位を約 4Hz で律動的にひっかく運動が生ずる<sup>1-4)</sup>。実験的には古く Sherrington<sup>1-3)</sup> がイヌおよびネコで、Brown<sup>5)</sup> がモルモットで scratch reflex を引き起こし、下肢筋群の活動パターンを観察し報告している。この場合、Sherrington<sup>1-3)</sup> は、下丘レベルで除脳したネコ、頸髄上端で脊髄を全切断した脊髄ネコ、頸髄下部から胸髄第 10 (T10) レベルの間で全切断された下位脊髄イヌなどでこの反射を観察している。この反射の末梢皮膚受容野は、イヌでは、頸部、肩、肘部までの上腕外側端、背中と広範囲にわたるが、ネコでは、主に耳介と首の部分に限られている。特に耳介刺激により、除脳または脊髄ネコのいずれにおいても、この反射が最も生じやすい。この scratch reflex を引き起こす耳介への適合刺激は、皮膚のむずむずした感じをひきおこす (tickling), あるいは毛が軽くひっぱられるといったような軽い機械的刺激である<sup>6)</sup>。一方、Sherrington<sup>1-3)</sup> は、下部頸髄で脊髄を切断したイヌで、背中の末梢皮膚受容野を電気刺激した時もこの反射が引き起こされることを観察している。また、Deliagina *et al.*<sup>4)</sup> は、除脳あるいは上部頸髄 (C1 上端) で脊髄を切断した脊髄ネコで、C1-C2 頸髄後角部 (頸髄背面から深さ約 1 mm) を電気刺激 (30Hz, 矩形波) し、ほとんど全例に scratch reflex を引き起こしている。最近、著者ら<sup>7)</sup> も、上部頸髄 (C1) で脊髄を切断した脊髄ネコで、耳介辺縁部の受容野を電気刺激 (50Hz, 矩形波) することによって scratch reflex が生ずることを報告した。

耳介の受容野は、脊髄ネコでは、耳介外縁部 (scapha 外縁) と、いわゆる耳たぶの部分に相当する小袋 (bursella) に限局している。この反射の耳介からの求心路に関しては、耳介を支配する求心線維の選択的切断実験で、反射の起こり方の変化を観察することによって研究された<sup>3)</sup>。それによると、下丘レベルで脳幹を全切断された除脳ネコでは、3つの入力経路、すなわち迷走神経の耳介枝、三叉神経の脊髄根、および脊髄神経の頸髄後根がこの反射入力の求心路になっているとみなされた。頸髄第 1 (C1) 上端で脊髄を全切断された脊髄ネコでは、頸部脊髄神経のみがこの反射の求心路となると考えられる。

この反射の脊髄神経の求心路に関しては、その脊髄入口レベルの範囲、また、その各々の入口レベルによって、反射入力としてどの程度寄与するかよくわかっていない。

そこで今回著者は、まず、scratch reflex に関与するとみなされる耳介からの求心線維が、各頸部髄節レベルへ投射する程度を定量的に明らかにするため、神経線維の軸索輸送を応用した、逆行性 HRP (horseradish peroxidase) 法<sup>8)</sup> を用い、脊髄ネコについて主として下記の 3 点を解析した。(1) scratch reflex の耳介受容野に相当する限局した皮膚領域に HRP 水溶液を注入し、C1 から C4 レベルの頸部脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion, 以下 DRG と略す) における、HRP で逆行性に標識される陽性細胞数を数え、各頸髄レベルでの量的差異を調べた。(2) 耳介受容野内の部位の違いによる求心線維の脊髄入口レベルを知るため、耳介の注入部位を変え、各レベルの DRG における陽性細胞の数、分布に違いがみられるかどうかを比較した。(3) 各々の脊髄神経節内で陽性細胞の分布にいわゆる somatotopic organization (体性機能の局在機構) が存在するかどうかを調べた。

なお、本研究の一部はすでに抄録として発表済みである<sup>9)</sup>。

## 2 実験方法

### 2.1 標本作製及び HRP 注入法

実験には、ネコ 27 匹 (体重 2.0-3.5 kg, 雌又は雄) を用いた。ネコを、pentobarbital sodium (Nembutal, 25-35 mg/kg の腹腔内注射により麻酔し、耳介皮下へ HRP 水溶液を注入した。まず予備実験として 1 匹 (2 例) で、HRP 耳介注入部位での HRP 拡散の程度を調べた。本実験に用いた 26 匹中 19 匹について、耳介の限局した受容野から頸部 DRG の各レベルへの求心線維の投射量に関するデータが得られた。他の 7 匹では、組織化学反応の不完全、神経節の取り出し時の組織破壊などのため、データとして採用しなかった。信頼できるデータの得られた 19 匹中、11 匹では左右両側耳介 (22 例)、8 匹については片側耳介 1 カ所 (8 例) のみへ HRP 水溶液を注入した。HRP 試薬として、Sigma type II を 13 匹 (23 例) に、東洋紡 Grade IC を 7 匹 (7 例) にそれぞれ使用した。HRP 注入法は通常よく用いられる方法<sup>8)</sup> で、30-40% HRP 水溶液 (W/V) を作製し、Sigma type II は 8-40 mg, 東洋紡 Grade IC は 2-6 mg の量をそれぞれ 10  $\mu$ l ハミルトンマイクロシリンジを用いて耳介へ注入した。脊髄ネコの耳介

受容野<sup>3)</sup>と、今回の実験における HRP 注入部位を Fig. 1 に示す。脊髄ネコの scratch reflex の受容野は、scapha 外縁部と bursella 近傍に限局しているため、耳介注入部位を 4 カ所に細分化し、各部位に限局して HRP を注入した。注入部位での拡散の程度を調べるため予備実験として用いた 1 匹 (2 例) のネコでは、bursella および scapha 外縁部先端に限局して、東洋紡 Grade IC 30% 水溶液を、各々 5 mg 注入した。比較のため 4 匹 (4 例) で、受容野外の部位 (耳介中央部 concha) にも HRP を注入した。各注入部位ごと、左右注入側ごとに使用したネコの例数を Table 1 に示す。

## 2.2 灌流固定

ネコは、HRP 注入後 72–76 時間生存させ、再び注入時と同様に麻酔し、以下の方法で灌流固定した。すなわち開胸後、左室壁にカニューレを刺入し、右心耳を切開した後、生理食塩水 (25–37°C) 1000 cc で急速にリンスし、次に 1% パラホルムアルデヒド、1.5% グルタルアルデヒド、320 mOsm 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) 混合液 1000 cc を、最初の半量は急速に、残り半量は、20–30 分間でゆっくり灌流固定した。引き続き、10% 蔗糖加磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) を同量、同様の

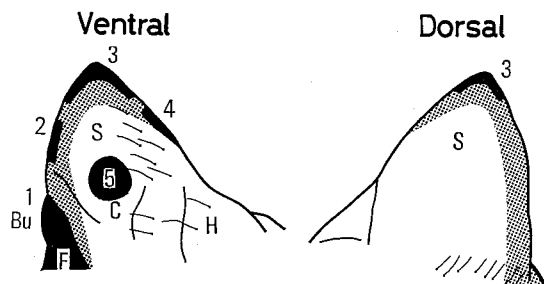


Fig. 1 Receptive field of the scratch reflex and HRP injection sites. Hatched area shows the receptive field of the scratch reflex. Black areas show HRP injection sites. Abbreviations used; C: concha, F: lappets from bursella to concha, Bu: bursella, H: helix, S: scapha, Ventral: ventral view, Dorsal: dorsal view.

Table 1 Number of cats used in this study.

HRP injection site	Rt.	Lt.
Bursella	9	3
Scapha margin		
tip	2	7
anterior part	1	3
posterior part	1	0
Concha	2	2
Total	15	15

方法で灌流した。

## 2.3 組織化学反応

灌流固定終了後、直ちに HRP 注入側 DRG の C1 から C4 (最初の 9 匹, 15 例は C5 まで取り出し調べたが、全例で C5 レベルに陽性細胞がなかったため、以後の実験では C4 までとした。)を取り出し、10% 蔗糖加磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に 1 日保存した後、厚さ 60  $\mu$ m の凍結切片を作製した。各切片を磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に 1–3 日保存した後、TMB (tetramethylbenzidine) 法<sup>10)</sup>で 1 日間隔で数回 (1–3 回) に分けて反応させた。各々で、反応温度 19–23°C、各 incubation solution 25 ml 当たり 0.3% 過酸化水素水添加量 0.75–1.25 ml の範囲内で反応条件を少し変えた。反応切片をゲラチン被覆を施したスライドガラス上に貼布し、後染色は、1% Neutral red で行い、組織標本を作製した。

## 2.4 HRP 注入部位からの拡散

耳介注入部位における HRP の拡散は、生存期間、反応方法によって特に影響を受けやすいとされている<sup>8)</sup>ので、これらの点を考慮に入れて、注入部位での拡散の程度を調べた。予備実験として 1 匹のネコ (2 例) で、左右耳介受容野 (bursella, scapha 先端部, 右左 2 カ所ずつ) に、各々灌流固定施行の 70 時間および 5 時間前に HRP を注入した。灌流固定後耳介注入部位を取り出し、TMB 法と比べて注入部位での halo と center との区別が付きやすく、拡散の程度を知る上ではより有用と思われる BDHC (benzidine dihydrochloride) 法<sup>9)</sup>で反応を行った。

## 2.5 HRP 陽性細胞の定量的観察

組織標本を明視野顕微鏡下に、40–100 倍で観察し、各切片中の逆行性に標識された HRP 陽性細胞数を数え、必要に応じ写真撮影を行なった。各神経節から、神経節細胞を含む切片が 10–20 枚得られた (組織破壊が強かったり、神経節細胞が少なく、陽性細胞を認めがたい切片は除外した)。HRP 反応顆粒が細胞質内に多数認められる細胞を数え、隣接する切片と二重に数えられることを避けるため、細胞に核を認めず、また、形の変形している細胞片は除外した。

耳介の HRP 注入部位が異なると、各頸部 DRG への求心線維投射量、分布がどの様になるかを知るため、C1–C4 各 DRG の HRP 陽性細胞数 (1 切片当たり平均陽性細胞数  $\pm$  1 標準偏差、並びに総数) を調べ、各例の 1 切片当たりの陽性細胞数の平均値を、注入部位別にヒストグラムとしてまとめた。

注入部位別に、各髄節の DRG 間で平均 HRP 陽性

細胞数の母平均値に有意差があるかどうか比較するため、統計学的処理にはt-検定 (paired t-test) を行ない、有意水準は5%とした。

次に、耳介受容野からの求心線維の種類、太さなどを推定するため、DRG 内の陽性細胞の大きさを調べた。2匹(2例)のネコから、明確に核を認める陽性細胞を、C1-C3 の各 DRG で各々50個ずつ無作為に選び、明視野顕微鏡下に、100~250倍で、マイクロメーターで直径を測定した。直径は、陽性細胞の細胞体の最大長軸の先端から先端までを長径、これとほぼ垂直方向の最小短軸を短径として測定した。

### 3 成 績

#### 3.1 HRP 注入部位からの拡散の程度

Bursella 並びに scapha 外縁部先端に注入した2例において、HRP 注入後灌流固定までの時間が5時間、および70時間と差があったが、HRP 液の注入部位での拡散は、両者ともほぼ同じで約4mmの範囲内にと

どまり、肉眼的に、円形から楕円形に濃く反応した領域として観察された。従って、この実験における HRP 取り込みは、ほぼ注入部位に限局しているとみなされた。

#### 3.2 DRG 内陽性細胞の分布 (Fig. 2)

耳介受容野へ HRP 注入後約3日間生存させた21例では、注入側と同側のC1~C3 DRG, 5例ではC1~C4 DRG に陽性細胞を認めた。Concha 注入4例では、C1~C3 DRG で少数しか陽性細胞を認めなかった。いずれのレベルの神経節においても、陽性細胞は、ほぼ神経節内全体に散在して分布しており、明らかな somatotopic organization は認められなかった。

#### 3.3 耳介求心線維の頸髄入口レベル

##### 3.3.1 Bursella 注入例 (Table 2, Fig. 3)

Bursella に注入した12例では、HRP 陽性細胞は、C2 DRG で最も多く、1切片当たり平均100個以上が3例、50個以下が4例、最も多い1切片では290個認められた。全例の平均値を平均すると、約71個であった。

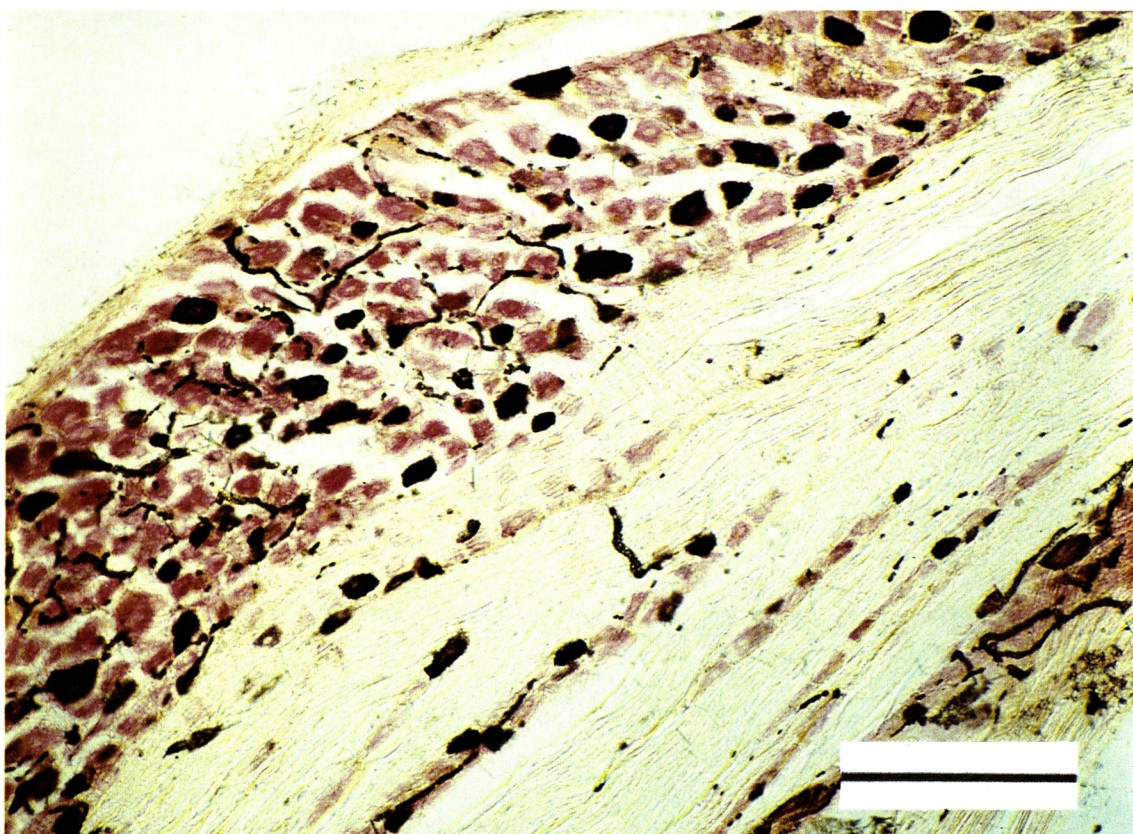


Fig. 2 Bright-field photomicrograph showing HRP labeled cells in C2 dorsal root ganglion. HRP was injected into the tip of the scapha margin. Longitudinal section.  $\times 150$ , scale, 200  $\mu\text{m}$ .

Table 2 No. of HRP-labeled DRG cells at different spinal levels.

HRP injected into burcella				Labeled cells				
Cat No.	Inj. side	HRP type	Dosage (mg)	DRG	C1	C2	C3	C4
5	R	Type II (20%)	10	①	3.7±4.4( 41/11)	11.5± 9.9(150/13)	1.9± 1.6( 37/19)	0 ( 0/14)
15	R	Type II (30%)	20	①	1.7±1.7( 10/ 6)	76.5±31.1(306/ 4)	6.0± 1.0( 12/ 2)	0 ( 0/ 3)
20	R	Type II (30%)	20	①	10.7±7.6( 32/ 3)	47.7± 4.8(143/ 3)	2.7± 1.2( 8/ 3)	0 ( 0/ 3)
				②	1.0±0.8( 3/ 3)	11.5±10.8( 46/ 4)	0.3± 0.5( 1/ 3)	0 ( 0/ 3)
22	R	Type II (30%)	20	①	3.5±0.5( 7/ 3)	38.3±16.5(115/ 3)	0.3± 0.5( 1/ 3)	0 ( 0/ 3)
				②	10.0±1.0( 20/ 2)	168.8±37.4(675/ 4)	23.0±14.0( 92/ 4)	0 ( 0/ 4)
				③	4.0±0.7( 16/ 4)	39.3± 9.0(118/ 3)	2.2± 1.9( 26/12)	0 ( 0/ 9)
24	R	Type II (30%)	20	①	5.3±3.5( 21/ 4)	109.6±17.9(548/ 5)	99.3±20.5( 397/ 4)	0 ( 0/ 5)
				②	26.3±2.3(105/ 4)	194.5±56.6(778/ 4)	168.0±41.0( 672/ 4)	0 ( 0/ 4)
				③	20.0±3.0( 40/ 2)	172.6± 1.9(863/ 5)	102.3±37.1( 614/ 6)	0 ( 0/ 8)
25	R	Type II (30%)	20	①	0.7±0.9( 2/ 3)	145.7±47.9(437/ 3)	76.5±13.2( 306/ 4)	6.0± 6.5( 18/ 3)
				②	5.5±0.5( 11/ 2)	180.0± 0 (360/ 2)	72.0±12.0(1224/17)	15.1±14.0(121/ 8)
26	R	Type II (30%)	10	①	4.0±2.8( 20/ 5)	13.8± 6.7( 55/ 4)	0 ( 0/ 5)	0 ( 0/ 5)
				②	8.5±6.2( 34/ 4)	35.3±15.3(141/ 4)	0.3± 0.4( 1/ 4)	0 ( 0/ 4)
				③	11.1±7.3(100/ 9)	34.0±16.1(170/ 5)	0.5± 1.2( 5/10)	0 ( 0/ 7)
30	L	Type II (30%)	12	①	3.0±0 ( 3/ 1)	41.5± 6.5( 83/ 2)	25.0± 4.7( 100/ 4)	0 ( 0/ 4)
				②	7.3±3.4( 22/ 3)	64.8±20.0(324/ 5)	66.2±31.0( 331/ 5)	0 ( 0/ 6)
30	R	TGIC (30%)	6	①	1.8±2.0( 7/ 4)	4.0± 1.4( 12/ 3)	54.5± 8.8( 218/ 4)	0.5± 0.5( 2/ 4)
				②	1.0±0 ( 1/ 1)	20.0± 5.0( 40/ 2)	67.0±20.0( 402/ 6)	1.3± 1.2( 8/ 6)
32	R	Type II (30%)	9	①	6.0±4.5( 18/ 3)	116.0±20.0(232/ 2)	103.7± 6.6( 311/ 3)	0 ( 0/ 3)
				②	6.5±2.7( 26/ 4)	127.4±40.9(637/ 5)	100.8±18.0( 403/ 4)	0 ( 0/ 4)
33	L	Type II (30%)	16	①	4.3±2.7( 17/ 4)	80.8±13.4(323/ 4)	38.0±11.3( 152/ 4)	0 ( 0/ 4)
				②	2.8±2.3( 17/ 6)	33.0± 3.0( 66/ 2)	32.9±10.9( 263/ 8)	0 ( 0/ 9)
				③	—	48.3±11.1(193/ 4)	—	—
35	L	Type II (30%)	9	①	1.0±1.7( 4/ 4)	66.0±27.5(198/ 3)	110.4±10.2( 552/ 5)	0 ( 0/ 5)
				②	3.4±3.1( 17/ 5)	—	—	—

Values are means±SD of the labeled cells. Fraction in parentheses is the total number of labeled cells divided by number of observed slices. ①②③ represent number of serial reactions made in one day interval. Survival time; 72-74 hrs.

HRP type ..... Type II: Sigma Type II, TGIC: Toyobo grade I-C.

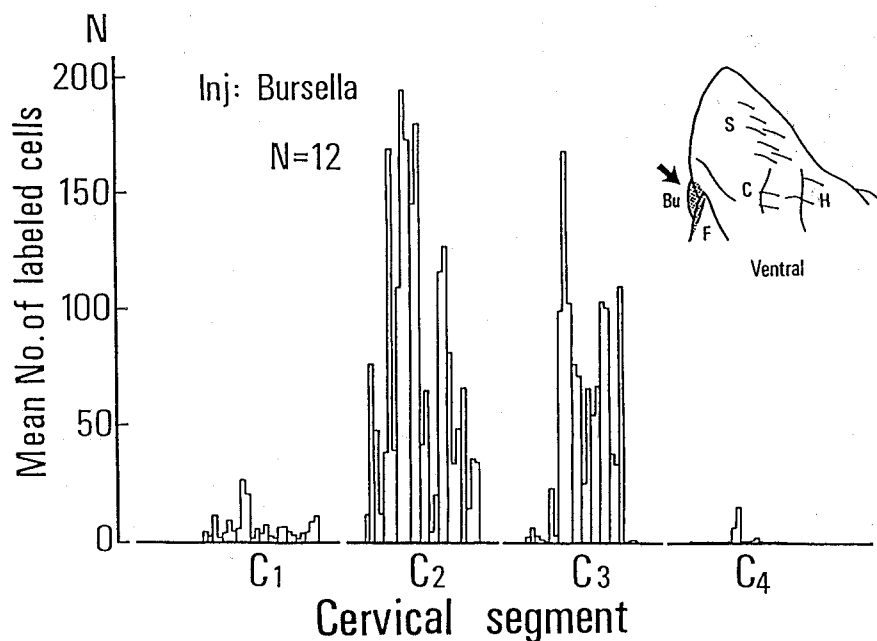


Fig. 3 Histogram showing the distribution of HRP labeled cells in DRGs of different cervical segments (C1-C4). HRP was injected into bursella. Ordinate; mean number of HRP labeled cells of each section. Abscissa; an arrow in the right side inset indicates the HRP injection site.



次に C3 DRG が多く、平均 100 個以上が 3 例、50 個以下が 6 例であった。全体の平均値は、約 48 個であった。C1 DRG では、1 切片当り平均陽性細胞数は、1~20 個と少なく、全体の平均値は、約 5 個であった。C4 DRG では、2 例においてのみ平均 1~15 個しか陽性細胞を認めなかった。各髄節間で、全体の母平均値に差があるかどうか、paired t-test を行なった結果、C2 と C3 では、両群間に有意差をみなかった ( $P>0.05$ )。C2 と C1、C3 と C1 間では、共に前者の方が有意に高値であった (各々  $P<0.001$ ,  $P<0.01$ )。

### 3.3.2 Scapha 外縁注入例 (Table 3, Fig. 4)

耳介外縁部に注入した 14 例では、陽性細胞は、C2 DRG で最も多く、1 切片当り平均 100 個以上が 5 例、50 個以下が 5 例、最も多い 1 切片では 379 個認められ、全体の平均値は、約 79 個であった。次に C3 DRG に陽性細胞が多かったが、平均 1~40 個であり、全体の平均値は、約 12 個と、bursella 注入例と比較して著しく少なかった。C1 DRG では、全体の平均値は、約 6

個であった。C4 DRG では、3 例において、いずれも平均 10 個以下しか陽性細胞を認めなかった。C2 は、C3 および C1 に比し、陽性細胞数は有意に高値であった (各々  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。しかし、C3 と C1 の間には、有意差がなかった ( $P>0.05$ )。

### 3.3.3 Concha 注入例 (Table 4, Fig. 5)

脊髄ネコでは scratch reflex を引き起こさない耳介中央部に HRP を注入した 4 例では、いずれのレベルでも陽性細胞は極く少数しか認められず、C2 DRG においても、1 切片当り平均陽性細胞数は、20 個以下であり、全体の平均値は約 8 個であった。この場合、同時に迷走神経の上神経節、顔面神経の膝神経節を取り出し調べたところ、陽性細胞が 1 切片当り平均各々約 70、および 15 個と多数認められた。

### 3.4 陽性細胞の大きさ (Fig. 6)

C1-C3 DRG 各レベルでの陽性細胞の長径の平均値は、C1;  $46.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ , C2;  $54.0 \pm 11.4 \mu\text{m}$ , C3;  $47.2 \pm 10.0 \mu\text{m}$  であった。短径の平均値は、C1;

Table 3 No. of HRP-labeled DRG cells at different spinal levels.

HRP injected into scapha				Labeled cells						
Cat No.	Inj. side	HRP type	Dosage (mg)	DRG	C1	C2	C3	C4		
5	L(T)	Type II (20%)	40	①	$0.5 \pm 0.8$ (5/10)	$50.7 \pm 21.6$ (558/11)	$9.7 \pm 7.3$ (126/13)	0	(0/12)	
9	R(T)	TGIC (30%)	3	①	0 (0/8)	$42.9 \pm 26.0$ (472/11)	$40.9 \pm 11.6$ (491/12)	$8.9 \pm 3.7$ (89/10)		
				②	—	$33.6 \pm 12.0$ (403/12)	$15.8 \pm 9.3$ (189/12)	—		
15	L(T)	Type II (30%)	20	①	0 (0/1)	$5.2 \pm 3.4$ (26/5)	0 (0/2)	0	(0/2)	
				②	—	$30.3 \pm 23.6$ (121/4)	—	—		
18	R(T)	TGIC (50%)	3	①	$1.0 \pm 0$ (2/2)	$112.0 \pm 9.0$ (224/2)	$37.0 \pm 4.0$ (74/2)	0	(0/2)	
				②	$2.8 \pm 2.5$ (11/4)	$101.7 \pm 3.1$ (305/3)	$36.3 \pm 16.8$ (145/4)	0	(0/4)	
				③	$2.0 \pm 2.3$ (8/4)	$59.5 \pm 7.5$ (119/2)	$16.0 \pm 6.1$ (64/4)	0	(0/4)	
20	L(T)	Type II (30%)	20	①	$21.3 \pm 4.5$ (64/3)	$117.3 \pm 25.3$ (352/3)	$0.3 \pm 0.5$ (1/3)	0	(0/3)	
				②	$4.0 \pm 0.8$ (12/3)	$25.3 \pm 15.0$ (101/4)	$0.3 \pm 0.5$ (1/3)	0	(0/4)	
				③	$4.0 \pm 5.0$ (12/3)	$65.0 \pm 15.0$ (130/2)	$0.3 \pm 0.4$ (1/3)	0	(0/4)	
22	L(T)	Type II (30%)	20	①	—	$58.3 \pm 14.9$ (175/3)	$0.3 \pm 0.5$ (1/3)	0	(0/3)	
				②	—	$139.0 \pm 16.6$ (556/4)	$28.8 \pm 21.1$ (115/4)	0	(0/4)	
				③	—	$66.2 \pm 33.2$ (728/11)	$5.4 \pm 6.1$ (54/10)	0	(0/6)	
24	L(T)	Type II (30%)	20	①	$8.2 \pm 5.2$ (41/5)	$115.6 \pm 14.7$ (578/5)	$4.0 \pm 2.2$ (20/5)	0	(0/5)	
				②	$30.0 \pm 2.7$ (120/4)	$219.7 \pm 14.9$ (659/3)	$13.3 \pm 7.5$ (53/4)	0	(0/4)	
				③	$15.3 \pm 3.3$ (46/3)	$111.0 \pm 24.0$ (222/2)	$10.8 \pm 3.0$ (43/4)	0	(0/5)	
25	L(T)	Type II (30%)	20	①	$1.5 \pm 1.1$ (6/4)	$11.0 \pm 2.8$ (44/4)	$22.5 \pm 12.4$ (90/4)	$1.5 \pm 2.1$ (6/4)		
				②	$1.0 \pm 0.8$ (3/3)	$8.8 \pm 2.2$ (35/4)	$39.9 \pm 24.3$ (439/11)	$3.1 \pm 1.9$ (34/11)		
29	R(P)	Type II (30%)	20	①	$3.3 \pm 2.3$ (13/4)	$82.0 \pm 21.0$ (164/2)	$12.5 \pm 9.8$ (50/4)	0	(0/4)	
				②	$7.5 \pm 2.5$ (15/2)	$190.0 \pm 109.0$ (760/4)	$6.3 \pm 8.5$ (25/4)	0	(0/3)	
				③	$3.8 \pm 0.9$ (23/6)	$280.0 \pm 87.6$ (2239/8)	$9.7 \pm 16.5$ (87/8)	0	(0/7)	
29	L(A)	Type II (30%)	20	①	$17.3 \pm 3.3$ (69/3)	$156.7 \pm 91.8$ (470/3)	$5.0 \pm 1.9$ (20/4)	0	(0/4)	
				②	$17.5 \pm 0.5$ (35/2)	$161.7 \pm 44.6$ (485/3)	$4.3 \pm 2.1$ (13/3)	0	(0/4)	
				③	$6.0 \pm 1.4$ (24/4)	$252.0 \pm 26.4$ (1260/5)	$1.9 \pm 2.4$ (17/9)	0	(0/7)	
31	L(T)	TGIC (30%)	3	①	$20.5 \pm 7.5$ (41/2)	$39.3 \pm 16.5$ (118/3)	$11.3 \pm 3.4$ (34/3)	—		
				②	$9.3 \pm 6.5$ (37/4)	$21.6 \pm 9.2$ (173/8)	$10.6 \pm 4.5$ (74/7)	$1.4 \pm 1.0$ (11/8)		
32	L(A)	Type II (30%)	16	①	0 (0/3)	$78.5 \pm 18.5$ (157/2)	0 (0/3)	0	(0/3)	
				②	—	$80.0 \pm 0$ (160/2)	$0.2 \pm 0.4$ (1/5)	0	(0/5)	
33	R(A)	Type II (30%)	16	①	$7.8 \pm 3.6$ (31/4)	$11.5 \pm 7.7$ (46/4)	$7.5 \pm 4.0$ (30/4)	—		
				②	$4.4 \pm 1.5$ (44/10)	$9.7 \pm 7.4$ (68/7)	$4.6 \pm 2.6$ (41/9)	0	(0/6)	
				③	—	$12.0 \pm 7.0$ (24/2)	—	—		
37	L(A)	Type II (40%)	8	①	$1.4 \pm 1.0$ (7/5)	$102.3 \pm 16.1$ (614/6)	$11.3 \pm 3.3$ (68/6)	0	(0/3)	
				②	—	$80.8 \pm 23.6$ (485/6)	$10.1 \pm 9.0$ (162/16)	0	(0/10)	

Format is the same as Table 2. Abbreviations used; T-tip of scapha margin, P-posterior part of scapha margin, A-anterior part of scapha margin. Survival time; 72-76 hrs.

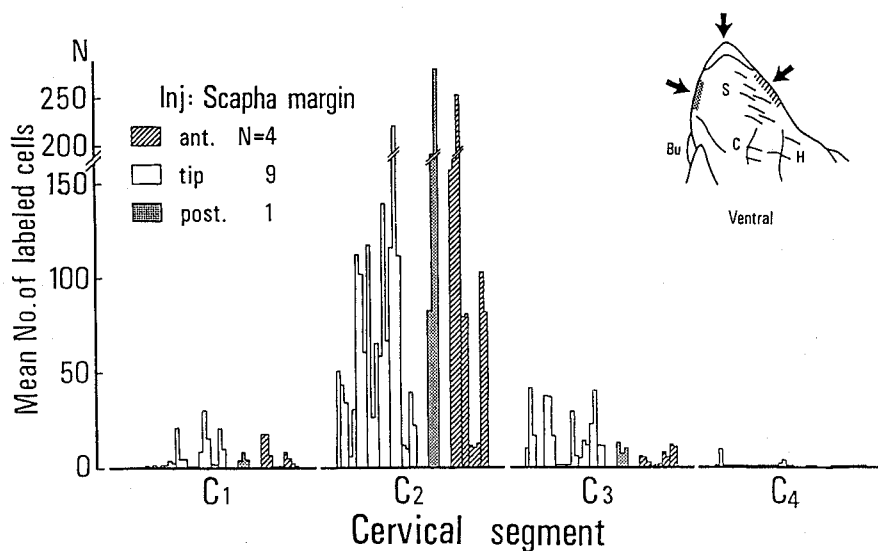


Fig. 4 Histogram showing the distribution of HRP labeled cells. HRP was injected into the margin of scapha. Format is the same as Fig. 3. Arrows indicate three HRP injection sites. Hatched region; anterior scapha, shaded region; posterior scapha, White region; tip of scapha.

Table 4 No. of HRP-labeled DRG cells at different spinal levels.

HRP injected into concha				Labeled cells					
Cat No.	Inj. side	HRP type	Dosage (mg)	DRG	C1	C2	C3	C4	
34	L	TGIC (30%)	2	①	0 (0/4)	1.0±0.7 (4/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)
				②	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)
				③	0 (0/5)	0.4±0.8 (2/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
				④	0 (0/1)	0 (0/2)	0 (0/6)	0 (0/5)	0 (0/5)
37	R	Type II (40%)	8	①	0 (0/4)	9.0±5.1 (54/6)	6.0±4.8 (42/7)	0 (0/4)	0 (0/4)
				②	0 (0/5)	8.8±3.5 (79/9)	2.6±2.9 (41/16)	0 (0/11)	0 (0/11)
40	L	TGIC (30%)	2	①	0 (0/2)	2.0±1.4 (8/4)	0.2±0.4 (1/5)	—	—
				②	0 (0/6)	5.7±4.1 (17/3)	1.0±1.2 (13/13)	—	—
48	R	TGIC (30%)	2	①	0 (0/2)	21.8±12.4 (87/4)	0 (0/6)	—	—
				②	0 (0/7)	11.9±7.8 (178/15)	0 (0/17)	—	—

Format is the same as Table 2. Survival time; 72-74 hrs. (Cat 40; 50 hrs.)

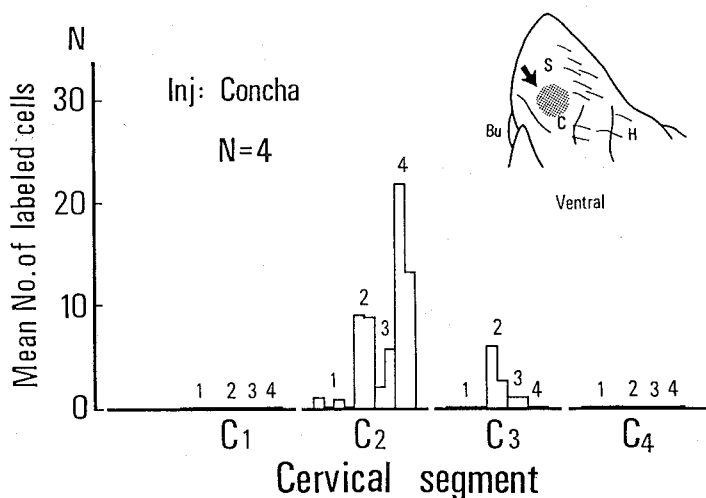


Fig. 5 Histogram showing the distribution of HRP labeled cells. HRP was injected into concha. Format is the same as Fig. 3.

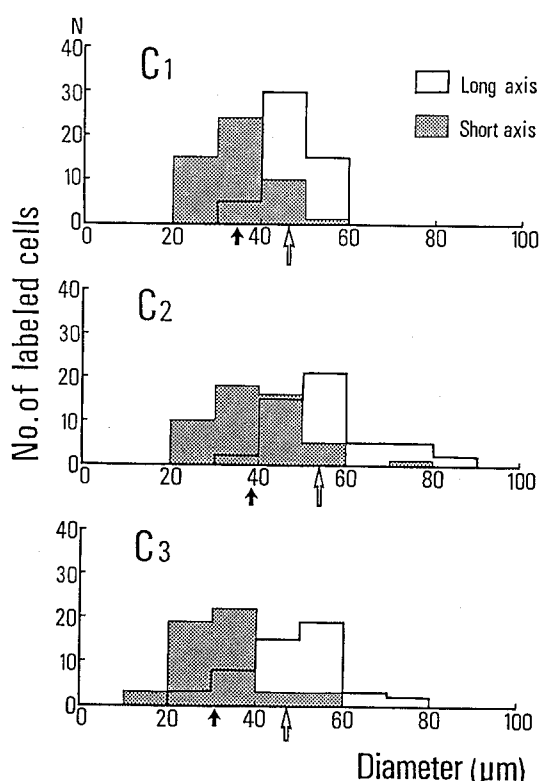


Fig. 6 Histogram showing the distribution of diameters of HRP labeled cells in C1-C3 DRGs. Ordinate; number of HRP labeled cells. Abscissa; diameter of HRP labeled cell. Shaded and white areas correspond to the diameters in the short and long axes respectively. Black arrows indicate the mean diameter in short axes and white arrows indicate the mean diameter in long axes. Data were obtained in two cases from 50 labeled cells of each segmental level from C1 to C3.

$34.4 \pm 6.9 \mu\text{m}$ , C2;  $38.4 \pm 9.6 \mu\text{m}$ , C3;  $30.9 \pm 8.4 \mu\text{m}$ であった。これらの結果から、陽性細胞の大きさは、各レベルで大差なく、長径  $40-50 \mu\text{m}$ 、短径  $30-40 \mu\text{m}$ の楕円形小型の細胞が多いことがわかった。長径  $60 \mu\text{m}$ 以上の大型細胞は、C2, C3レベルで少数しか認められなかった。

#### 4 考 察

##### 4.1 逆行性 HRP 法の問題点

今回の実験では、HRP 注入後のネコの生存期間を 72~76 時間とした。Ygge<sup>11)</sup>は、ラットで第 7 胸髄 (T7) から第 9 (T9) までの脊髄神経枝に HRP を注入し、生存期間を 24 時間から 48 時間まで様々に変えて、

胸髄レベルの脊髄神経節細胞を観察したが、HRP 陽性細胞の数、分布に影響がなかったと報告している。本研究におけるネコでの約 3 日間という生存期間は、ラットとネコの体の大きさの違い、注入部位から観察部位までの距離等を考慮に入れると、逆行性に標識される陽性細胞を調べるためには、適当な期間であったとみなされる。

耳介受容野の注入部位に関しては、HRP 注入量が  $10-20 \text{ mg}$  と比較的多量な例が多かったため、HRP 注入液が、耳介受容野の限局した注入部位からどの位周辺へ拡散したかが問題となる。 $5 \text{ mg}$  注入の場合、拡がりには約  $4 \text{ mm}$  であり、したがって、HRP は、目的とする耳介受容野にほぼ限局して注入され、その部位の神経末端から取り込まれたと推測される。この場合、DRG の陽性細胞の中に、scratch reflex 入力線維由来のものが多数含まれているとみなされるが、scratch reflex を生じさせる求心線維内へ HRP を選択的に直接注入したわけではない。したがって、HRP 陽性細胞中には、scratch reflex に直接関与しない求心線維由来のものも含まれているとみなされる。

##### 4.2 脊髄神経節内の陽性細胞の分布

C1-C3 のいずれのレベルにおいても、神経節内の陽性細胞が、ある部分に局在するような傾向はみられず、特に陽性細胞の多くみられた C2 DRG では、神経節全体にわたって散在性に広く陽性細胞の分布を認める例が多かった。したがって、神経節内に耳介受容野の部位別に陽性細胞が局在するという、いわゆる somatotopic organization は認められなかった。これは、動物の種属をとわず、厳密な somatotopic organization が、様々なレベルでの脊髄後根神経節で認められないとする報告<sup>11)</sup>と一致する。しかし、C2, 第 2 仙髄 (S2) で somatotopic organization の傾向(変性実験により、C2 DRG の背内側部、腹側尾側部は、それぞれ、C2 後根背側枝、腹側枝に対応している)がみられたとする報告<sup>12,13)</sup>もある。むしろ、感覚の種類(modality)に対応した細胞集団(subgroup)が存在する可能性があるが、この点に関しては不明であり、今後の解析が待たれる。

##### 4.3 耳介求心線維の頸部脊髄神経節入口レベル

Hekmatpanah<sup>14)</sup>は、ネコの C1 から L4 のレベルで、触覚の皮膚節(tactile dermatome)を決定した。この報告によると、C1, C2 の dermatome は、同側耳介背側と同側耳介腹側辺縁部であり、C3 では、同側頸部のほぼ全域であった。Kirk<sup>15)</sup>は、ヒツジの dermatome を決定したが、ほぼ同様の結果であった。本研究では、



scratch reflex の受容野である scapha 外縁部と bursella 部に HRP を注入し、C1 から C5 DRG の陽性細胞を調べた。耳介からの求心路を HRP 法により調べた報告は、現在のところ見当たらない。Scapha 外縁部、bursella 注入例どちらにおいても、C2 レベルで陽性細胞が最も多く、C4 以下のレベルでは、陽性細胞はほとんど認められなかった。

ここで、成ネコの C1 から C4 DRG の正常細胞数についてみると、Duncan and Keyser<sup>16)</sup>、および Holmes and Davenport<sup>17)</sup> の報告を合わせると、C1 ; 3,000-4,000, C2 ; 18,000-32,000, C3 ; 28,000-31,000, C4 ; 18,000-21,000 となる。本研究では、1 例において、C2 DRG の正常細胞数を数えたが、約 9,600 であった。この細胞数の違いは、本研究では切片の厚さを 60  $\mu\text{m}$  としたのに対し、彼らの場合は 10  $\mu\text{m}$  であったため重複して数えた可能性が考えられる。その他に、染色法および算定方法の違い、ならびにネコの個体差なども関与するかもしれない。今回、C2 レベルで最も多く認めた 1 切片の陽性細胞数は 379 個、および C2 神経節全体の陽性細胞の総数は 3,163 個であった。したがって、C2 DRG では、多くても神経節全体の細胞の約 1/3 以下しか標識されなかったとみなされる。

耳介求心線維の脊髄入口レベルに関して、scapha 外縁注入例のうち 3 例で、C4 レベルにも極く少数陽性細胞を認めた。また bursella 注入例のうち 2 例においても C4 レベルに少数陽性細胞を認めたが、この場合は、耳介注入部位から頸部皮膚への拡散が関与している可能性がある。いずれにしても、陽性細胞数は極く少数であり、耳介受容野からの求心線維は、主として頸髄の C1 から C3 のレベルへ投射しているとみなされる。

今回得られた成績で注目されることの一つは、耳介 HRP 注入部位が異なると、陽性細胞の分布に違いがみられたことである。すなわち、scapha 外縁部に注入した例では、C2 レベルで最も多くの陽性細胞を認め、paired t-test によっても、C1, C3 レベルと有意差があった。しかし、bursella に注入した例では、やはり陽性細胞は C2 レベルで最も多かったが、C3 レベルと有意差はなかった。このことは、著者ら<sup>9)</sup>が、C1 上端で脊髄を全切断した脊髄ネコでの選択的切断実験から得られた以下の成績（未発表）とよく一致する。すなわち、(1)脊髄ネコで C1, C2 後根を全切断し、C3 の後根を残して、bursella を pinching した場合、scratch reflex が起きたが、scapha 外縁部を刺激しても scratch reflex は起きなかった。(2) C1, C3 後根を切断し、C2

後根を残しておくと、bursella, scapha 外縁部どちらの pinching によっても、scratch reflex が起きた。

次に、脊髄動物では、その刺激により scratch reflex の起きない concha に HRP を注入した例では、C1 から C3 DRG に少数しか陽性細胞を認めず、顔面神経膝神経節と迷走神経上神経節には多数の陽性細胞を認めた。この成績は、Sherrington の報告<sup>3)</sup>による、C2 あるいは C3 頸髄神経根を残して他の根(C1, 三叉神経, 迷走神経)を切断すると、concha を刺激しても scratch reflex が起きなかったという事実を裏づける。

今回得られた成績をまとめ、耳介受容野の神経支配領域のスキーマを、Fig. 7 の模式図に示した。C2 支配領域は、scapha 外縁部並びに bursella 部であり、C3, C1 領域もほぼ同じと考えられるが、C2 ほどその支配が強くないことがわかる。なお、図中右上の数字は、耳介受容野の HRP 注入部位に対応した、各例の 1 切片当り平均陽性細胞数の全例の母平均値を表わす。

#### 4.4 HRP 陽性細胞の大きさ

成熟哺乳動物の DRG では、種々の大きさの細胞が無作為に分布しており、また、DRG 細胞の大きさと軸索の直径が正比例関係にあることが知られている<sup>18)</sup>。Yoshida and Matsuda<sup>19)</sup>によると、adult mouse では、L4-6 DRG の細胞体の平均直径が 31.4  $\mu\text{m}$  の集団は平均直径が 3  $\mu\text{m}$  の A 線維に、13.9  $\mu\text{m}$  の集団は平均直径が 0.5  $\mu\text{m}$  の C 線維に接続し、各々がほぼ比例関係にあったという。また、Svaetichin<sup>20)</sup>は、カエルの脊髄神経節では、その細胞体の直径が 35-40  $\mu\text{m}$  以下のものが、一般的に無髄線維と接続すると述べている。今回、一部の陽性細胞の長径と短径を測定し、C1 から

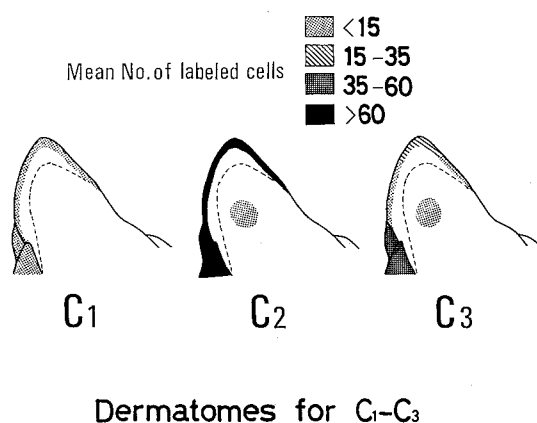


Fig. 7 Dermatomes for C1-C3 segments in pinna receptive areas based on HRP study. The marginal areas demarcated by dotted lines are the receptive fields of scratch reflex.

C3 のレベルの DRG で長径 40–50  $\mu\text{m}$ , 短径 30–40  $\mu\text{m}$  の楕円形小型細胞を多く認めた。したがって、動物の種属差, 標本数の少なさを考慮する必要があるが, 直径 1–5  $\mu\text{m}$  程度の細い有髄線維, あるいは無髄線維に接続する細胞体が主として標識されたものと推定される。耳介受容野を電気刺激し (50Hz, 矩形波, 持続時間 1ms), C2 後根入口部で求心性インパルスを導出記録した, 最近の著者らの成績<sup>9)</sup>では, 潜時から, 線維の伝導速度は, 約 20 m/s 以下のものが多く, 細い A $\delta$  線維と推定された。

#### 4.5 Scratch reflex のリズム発生機構

脊髄動物で耳介刺激により scratch reflex が容易に誘発されることから, この反射を生起するリズム発生機構が脊髄内に存在することが推定され<sup>3,6)</sup>, 腰髄レベルにその存在を仮定する報告がされている<sup>21–24)</sup>。しかし, 頸髄レベルにも, リズム発生機構の存在する可能性<sup>7)</sup>があり, この点を裏づけるためには, この反射の入力経路をさらに順行性に頸髄内まで追跡し, 脊髄灰白質内での 2 次ニューロンとの接続様式を調べることが, 今後必要になると思われる。

### 5 結 論

Scratch reflex の主な入力経路である, 耳介受容野からの求心線維が, 頸髄のどの髄節入口レベルへ投射し, 各レベルでその投射量にどの程度差があるかを定量的に知るため, 逆行性 HRP 法を用いて実験を行なった。すなわち, HRP を耳介受容野へ限局して注入し, C1–C5 DRG の陽性細胞を検索した結果, 以下の成績を得た。

(1) 脊髄ネコにおける scratch reflex の耳介受容野である bursella あるいは scapha 外縁に HRP を注入した例では, 陽性細胞を C1–C3 (少数例で C1–C4) DRG に認めた。いずれも C2 レベルに最も多く陽性細胞を認め (1 切片当たり平均 50–100 個以上が大部分), 次いで C3, C1 の順に多く, C4 以下にはほとんど認めなかった。

(2) 耳介受容野内の部位の違いによって, 入口レベルの分布が異なるかどうか知るため, 耳介注入部位を 5 カ所に分けて, 各レベルの DRG における陽性細胞の数, 分布を比較した。Bursella 注入例では, C2 と C3 レベルとで陽性細胞数に有意差がなかったが, scapha 外縁注入例では, C2 レベルが C3 レベルより有意に多かった。脊髄ネコでは, その刺激により scratch reflex を生じない耳介中央部に HRP を注入した例では, C1–C3 DRG にごく少数, 最も多い C2 DRG でも 1 切片

当たり平均陽性細胞数は, 約 20 個以下しか認めなかった。

(3) C1–C3 DRG で見られた陽性細胞は, いずれも楕円形小型細胞 (長径の平均が 40–50  $\mu\text{m}$ ) が多く, 神経節内での明らかな somatotopic organization は認めなかった。

以上の成績から, scratch reflex に関係した耳介からの求心線維は, 主に頸髄の C1 から C3 のレベルへ投射している可能性が示唆され, これらの求心線維は, 細い有髄線維あるいは無髄線維であろうと推定された。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜った本学生理学第 2 講座 青木 藩教授に深謝いたします。また, HRP 法に関し, 御教示, 御助言をいただいた解剖学第 1 講座 里見 肇講師ならびに御協力いただいた第 2 生理教室員各位に感謝いたします。

### 文 献

- Sherrington, C. S.: Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J. Physiol.(Lond.)* **34**, 1–50 (1906).
- Sherrington, C. S.: Notes on the scratch-reflex of the cat. *Q. J. Exp. Physiol.* **3**, 213–220 (1910).
- Sherrington, C. S.: Reflexes elicitable in the cat from pinna vibrissae and jaws. *J. Physiol.(Lond.)* **51**, 404–431 (1917).
- Deliagina, T. G., Feldman, A. G., Gelfand, I. M. and Orlovsky, G. N.: On the role of central program and afferent inflow in the control of scratching movements in the cat. *Brain Res.* **100**, 297–313 (1975).
- Brown, T. G.: Studies in the reflexes of the guinea-pig. I. The scratch-reflex in relation to "Brown-Sequard's epilepsy." *Q. J. Exp. Physiol.* **2**, 243–275 (1909).
- Sherrington, C. S.: *The Integrative Action of the Nervous System.* Yale University Press, New Haven, Conn (1906).
- Aoki, M., Kasaba, T. and Kurosawa, Y.: Genesis of scratching rhythm in spinal cats (abstract). *J. Physiol. Soc. Jpn. (Nippon Seirigaku Zasshi: Tokyo)*. **44**, 367 (1982).
- Mesulam, M. M.: *Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase.* John Wiley & Sons, Chichester (1982).
- Kurosawa, Y., Kasaba, T. and Aoki, M.: Spinal segmental levels of pinna afferents responsible for scratching reflex in the cat (abstract).

- J. Physiol. Soc. Jpn. (Nippon Seirigaku Zasshi : Tokyo). **46**, 376 (1984).
10. Mesulam, M. M.: Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry. A non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* **26**, 106-117 (1978).
11. Ygge, J.: On the organization of the thoracic spinal ganglion and nerve in the rat. *Exp. Brain Res.* **55**, 395-401 (1984).
12. Szentágothai, J. and Kiss, T.: Projection of dermatomes on the substantia gelatinosa. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **62**, 734-744 (1949).
13. Arlhac, A.: Mice en évidence d'une somatotopie au niveau du ganglion spinal chez le chat. *C. R. Soc. Biol.* **162**, 1979-1984 (1968).
14. Hekmatpanah, J.: Organization of tactile dermatomes, C1 through L4, in cat. *J. Neurophysiol.* **24**, 129-140 (1961).
15. Kirk, E. J.: The dermatomes of the sheep. *J. Comp. Neurol.* **134**, 353-369 (1968).
16. Duncan, D. and Keyser, L. L.: Further determinations of the numbers of fibers and cells in the dorsal roots and ganglia of the cat. *J. Comp. Neurol.* **68**, 479-490 (1938).
17. Holmes, F. W. and Davenport, H. A.: Cells and fibers in spinal nerves. IV. The number of neurites in dorsal and ventral roots of the cat. *J. Comp. Neurol.* **73**, 1-5 (1940).
18. Lieberman, A. R.: Sensory ganglia. In "The Peripheral Nerve" ed. by D. N. Landon, Chapman and Hall, London, p 196-278, (1976).
19. Yoshida, S. and Matsuda, Y.: Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular recording and horseradish peroxidase-injection techniques. *J. Neurophysiol.* **42**, 1134-1145 (1979).
20. Svaetichin, G.: Electrophysiological investigations on single ganglion cells. *Acta Physiol. Scand.* **24**(Suppl. 86), 1-57 (1951).
21. Berkinblit, M. B., Deliagina, T. G., Feldman, A. G., Gelfand, I. M. and Orlovsky, G. N.: Generation of scratching. I. Activity of spinal interneurons during scratching. *J. Neurophysiol.* **41**, 1040-1057 (1978).
22. Berkinblit, M. B., Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N. and Feldman, A. G.: Activity of motoneurons during fictitious scratch reflex in the cat. *Brain Res.* **193**, 427-438 (1980).
23. Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N. and Perret, C.: Efferent activity during fictitious scratch reflex in the cat. *J. Neurophysiol.* **45**, 595-604 (1981).
24. Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N. and Pavlova, G. A.: The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp. Brain Res.* **53**, 81-90 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学生理学第2講座 黒沢洋一